

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Februar 2004 (12.02.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/013614 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 15/12 // 27/02, C12M 1/42, B03C 5/02

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/008312

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. Juli 2003 (28.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 34 487.6 29. Juli 2002 (29.07.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): EVOTEC OAI AG [DE/DE]; Schnackenburgallee
114, 22525 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHNELLE, Thomas [DE/DE]; Koppenstrasse 65, 10843 Berlin (DE). MÜLLER, Torsten [DE/DE]; Hartriegelstrasse 39, 12439 Berlin (DE). SHIRLEY, Stephen [GB/GB]; Victoria Main Street, Brandon, Warks CV8 38W (GB).

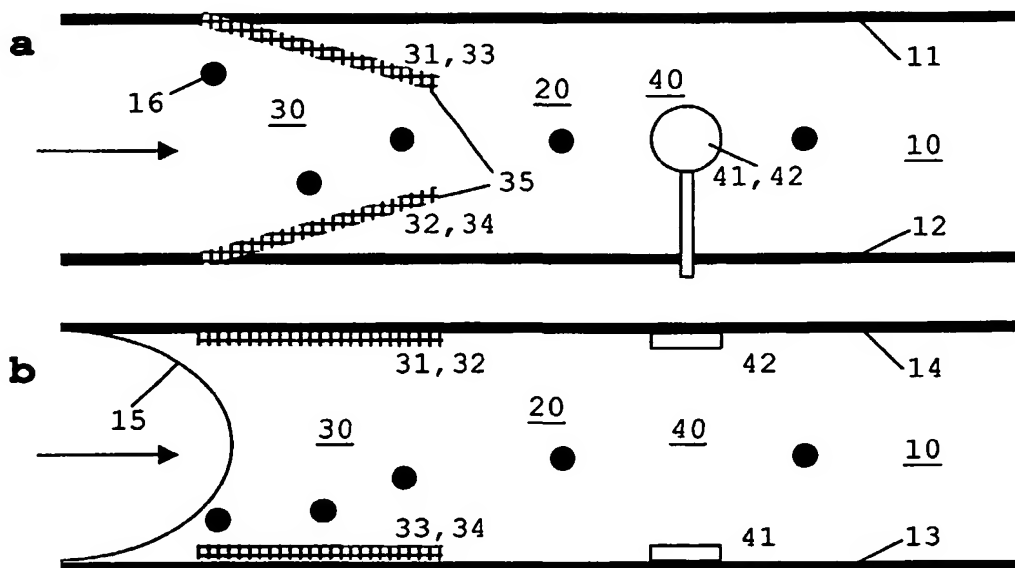
(74) Anwalt: HERTZ, Oliver; V. Bezold & Sozien, Akademiestrasse 7, 80799 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: IMPEDANCE MEASUREMENT IN A FLUIDIC MICROSYSTEM

(54) Bezeichnung: IMPEDANZMESSUNG IN EINEM FLUIDISCHEN MIKROSYSTEM



(57) Abstract: The invention relates to a method and to a measuring device used for impedance measurement in a fluidic microsystem, comprising a compartment (10) through which a fluid consisting of at least one suspended particle (16) flows and wherein at least one impedance detector (40) is arranged, enabling at least one impedance value to be detected in order to detect the at least one particle, said impedance value being characteristic of the impedance of the compartment and being modified by the presence of the at least one particle in a predetermined manner. The at least one particle is focussed at a predetermined distance in relation to the impedance detector. Said focussing includes movement of the at least one particle in relation to the fluid flowing in the compartment by dielectrophoretic forces which are exerted by means of at least two focussing electrodes (30).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/013614 A1



(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Es werden ein Verfahren und eine Messeinrichtung zur Impedanzmessung in einem fluidischen Mikrosystem mit einem Kompartiment (10) beschrieben, das von einer Strömung einer Flüssigkeit mit mindestens einem suspendierten Partikel (16) durchsetzt wird und in dem mindestens ein Impedanzdetektor (40) angeordnet ist, mit dem zur Detektion des mindestens einen Partikels mindestens ein Impedanzwert erfasst wird, der für die Impedanz des Kompartiments charakteristisch ist und der sich bei Anwesenheit des mindestens einen Partikels in vorbestimmter Weise ändert, wobei eine Fokussierung des mindestens einen Partikels in einen vorbestimmten Abstand relativ zum Impedanzdetektor erfolgt, wobei die Fokussierung eine Bewegung des mindestens einen Partikels relativ zur im Kompartiment strömenden Flüssigkeit durch dielektrophoretische Kräfte umfasst, die mit mindestens zwei Fokussierelektroden (30) ausgeübt werden.

Impedanzmessung in einem fluidischen Mikrosystem

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Impedanzmessung in einem fluidischen Mikrosystem, insbesondere Verfahren zur Partikeldetektion in fluidischen Mikrosystemen durch Impedanzmessungen, und Messeinrichtungen zur Durchführung derartiger Verfahren.

Es ist bekannt, biologische Zellen nach dem sog. Coulter-Counter-Prinzip zu zählen. Dabei werden die Zellen durch eine kleine Öffnung zwischen zwei Räumen bewegt, in denen zwei Elektroden angeordnet sind. Bei Änderung des elektrischen Widerstands zwischen den Elektroden wird eine Zelle in der Öffnung detektiert und gezählt. Dieses Prinzip wurde zunächst für makroskopische fluidische Systeme (typische Leitungsdimensionen im mm- bis cm-Bereich) entwickelt und zunehmend auch in fluidischen Mikrosystemen angewendet (WO 00/37628, S. Gawad et al. in „IEEE-EMBS Conference on Microtechnologies in Med. & Biol.“, 2000, Lyon, Frankreich, und M. Koch et al. in „J. Micromech. Microeng.“, Bd. 9, 1999, Seite 159-161).

Beispielsweise wird in WO 00/37628 ein Mikrosystem zur Zellpermeation (oder Zellfusion) beschrieben, in dem vor der Permeation eine Zelldetektion durch eine elektrische Widerstandsmessung erfolgt. Für eine größenabhängige Zellpermeation werden die Partikel unter der Wirkung negativer Dielektrophorese je nach ihrer Größe in verschiedene Teilkanäle des Mikrosystems überführt. In jedem Teilkanal werden die Partikel mit der strömenden Flüssigkeit an einem Elektrodenpaar vorbeibewegt, an dem die Widerstandsmessung erfolgt. Nachteilig an der Detektionstechnik gemäß WO 00/37628 ist, dass die Partikel in Bezug auf das jeweilige Elektrodenpaar nicht ausgerichtet werden. Eine Fokussierung ist nicht vorgesehen. Die Detektorsig-

nale besitzen daher eine verminderte Reproduzierbarkeit, die Detektion ist unzuverlässig.

Von Gawad et al. werden ebenfalls planare Impedanzsensoren oder Elektrodenpaare an gegenüberliegenden Wänden eines Kompartiments des Mikrosystems verwendet. Die Zellen werden zur Ausrichtung relativ zu den Sensoren durch eine Düse (z. B. Kanal mit einem Querschnitt von $20\text{ }\mu\text{m} \cdot 20\text{ }\mu\text{m}$) geführt, um ein gut auswertbares Impedanzsignal zu erhalten. Das Signal-Rausch-Verhältnis der Impedanzmethode hängt nämlich im Wesentlichen vom Verhältnis des Zellradius zum Kanalquerschnitt an einer Detektorelektrode ab (siehe Koch et al.). Nachteilig ist dabei jedoch, dass enge Düsen oder Kanäle sich durch eine vergrößerte Verstopfungsgefahr auszeichnen. Außerdem reduzieren sie den Zelldurchsatz.

Es ist ferner bekannt, die Impedanzmessung in fluidischen Mikrosystemen unter Verwendung eines Referenzelektrodensystems durchzuführen (s. Gavad et al.). Die Impedanzmessung erfolgt üblicherweise bei mindestens einer festen Frequenz im Bereich von einigen 10 kHz bis MHz. Durch die Verwendung mehrerer Frequenzen können zusätzliche Informationen über die detektierte Zellen gewonnen werden. Bei der Einzelzellimpedanzspektroskopie erfolgt die Impedanzmessung für ein bestimmtes Frequenzspektrum (s. H. G. L. Coster et al. in „BioElectroChem. BioEnerg.“, Bd. 40, 1996, Seite 79-98).

Die Verstopfungsgefahr kann vermieden werden, wenn anstelle einer Düse eine hydrodynamische Fokussierung vorgesehen ist. Ein prinzipieller Nachteil hydrodynamischen Fokussierung besteht jedoch darin, dass Messelektroden in der Regel an einer Kanalwand angebracht sind, eine Fokussierung in den Randbereich jedoch ausgeschlossen oder nur mit großem technischen

Aufwand realisierbar ist. Die hydrodynamische Fokussierung ist ferner nur begrenzt anwendbar. Sie wird insbesondere durch die Systemgeometrie (geringe Kanallänge) oder geringe Pumpraten erschwert. Außerdem kommt es bei der Fokussierung zu hydrodynamischem Stress, der insbesondere bei empfindlichen biologischen Zellen unerwünscht ist.

Es sind auch andere Detektionsprinzipien bekannt, die eigenständig realisiert oder mit Impedanzmessungen kombiniert werden. Beispielsweise basieren optische Verfahren auf einer Messung der Lichtstreuung der zu detektierenden Partikel. Dies setzt jedoch die Verwendung einer bestimmten Geometrie und transparenter Wandmaterialien im Mikrosystem voraus. Bei einer magnetischen Fokussierung erfolgt eine Annäherung der Zellen an Messelektroden mit Hilfe externer Magnetfelder. Hierzu müssen jedoch an die Zellen magnetische Teilchen angekoppelt werden, die darüber hinaus nachteilig für impedanzspektroskopische Messungen sind. Auch eine thermische Fokussierung mit lokalen Heizeinrichtungen ist nachteilig, da dabei die Zellen unerwünschten Temperaturänderungen ausgesetzt werden.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, verbesserte Verfahren zur Impedanzmessung in fluidischen Mikrosystemen bereitzustellen, mit denen die Nachteile der herkömmlichen Detektionsverfahren überwunden werden und die insbesondere eine verbesserte Fokussierung von Partikeln in der Nähe von Detektorelektroden ermöglichen. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, die Impedanzmessung in fluidischen Mikrosystemen dahingehend weiterzuentwickeln, dass Partikel nicht nur gezählt, sondern auch weitere Informationen über die Partikel gewonnen werden. Die Aufgabe der Erfindung ist es ferner, verbesserte Messeinrichtungen zur Impedanzmessung in fluidischen Mikrosystemen bereitzustellen.

Diese Aufgaben werden mit Verfahren und Messeinrichtungen mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 oder 14 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Eine Grundidee der Erfindung ist es, suspendierte Partikel, die in einem Kompartiment eines fluidischen Mikrosystems mit mindestens einem Impedanzdetektor erfasst werden sollen, unter der Wirkung dielektrophoretischer Feldkräfte, die im Kompartiment wirken, in die Nähe des Impedanzdetektors zu fokussieren. Mit mindestens zwei Fokussierelektroden werden hochfrequente elektrische Felder erzeugt, unter deren Wirkung mittels negativer Dielektrophorese die Partikel relativ zu einer Flüssigkeitsströmung im Kompartiment in einen Teilbereich der Strömung bewegt und damit in vorbestimmter Weise relativ zum Impedanzdetektor positioniert werden. Die Partikel werden im Kompartiment entlang einer vorbestimmten, durch die dielektrophoretische Fokussierung definierten Trajektorie am Impedanzdetektor vorbeibewegt. Durch die erfindungsgemäße Kombination des Impedanzdetektors mit den mindestens zwei Fokussierelektroden werden vorteilhafterweise die Nachteile herkömmlicher Fokussiertechniken überwunden. Es werden insbesondere unerwünschte Belastungen durch mechanische oder hydrodynamische Kräfte vermieden. Des Weiteren kann die dielektrophoretische Fokussierung optimal an die jeweils zu detektierenden Partikel angepasst werden.

Erfindungsgemäß erfolgt die Impedanzmessung mit mindestens einem Impedanzdetektor, der in einem von einer Flüssigkeitsströmung durchsetzten Kompartiment des Mikrosystems angeordnet ist. Das Kompartiment ist allgemein eine Leitungsstruktur im Mikrosystem, wie z. B. ein Kanal oder ein durchströmtes Reser-

voir. Typische Querschnittsdimensionen des Kompartiments liegen beispielsweise im Bereich von 200 μm bis 800 μm (Breite) 20 μm bis 100 μm (Höhe). Das Kompartiment ist in einem Chipkörper aus festem Material (z. B. Halbleiter, Keramik, Kunststoff oder dgl.) ausgebildet. Der mindestens eine Impedanzdetektor umfasst mindestens zwei Detektorelektroden, die an einer oder verschiedenen Wänden des Kompartiments angebracht sind. Die erfindungsgemäße dielektrophoretische Fokussierung von Partikeln umfasst allgemein eine Bewegung von Partikeln in einen Teilbereich der Strömung (Strömungssegment), in dem Partikel beim Vorbeitritt am Impedanzdetektor einen vorbestimmten, vorzugsweise verminderten, Abstand von einer der Detektorelektroden besitzen.

Erfindungsgemäß kann die Fokussierung stromaufwärts relativ zum Impedanzdetektor erfolgen. Diese Ausführungsform kann wegen der getrennten Ansteuerung von Fokussier- und Detektorelektroden vorteilhaft sein. Alternativ kann die Fokussierung am Impedanzdetektor erfolgen. Dabei können sich Vorteile durch einen vereinfachten Elektrodenaufbau ergeben.

Gemäß einer ersten vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung umfasst die dielektrophoretische Fokussierung eine Bewegung in einen Teilbereich der Strömung (z. B. in die Mitte der Strömung), der auf einer Verbindungslinie zwischen zwei an gegenüberliegenden Wänden des Kompartiments angeordneten Detektorelektroden liegt oder in dessen senkrechter Projektion auf eine Wand des Kompartiments mindestens eine Detektorelektrode angeordnet ist. Diese Bewegung besitzt den Vorteil, dass alle Partikel wie durch eine düsen- oder trichterförmig gebildete Feldbarriere in einem vorbestimmten Fenster an der mindestens einen Detektorelektrode vorbeitreten. Im Unterschied zu herkömmlichen Techniken erfolgt die Passage des Fensters ohne Be-

rührung von mechanischen, festen Bauteilen und unter Vermeidung fokussierender Strömungskräfte. Damit wird vorteilhafterweise eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) erzielt. Eine lateral versetzte Passage an der Detektorelektrode wird vermieden. Alternativ oder zusätzlich kann die dielektrophoretische Fokussierung eine Bewegung von Partikeln derart umfassen, dass sich der senkrechte Abstand eines an mindestens einer der Detektorelektroden vorbeitretenden Partikels vermindert. In diesem Fall wird der senkrechte Abstand der Partikelpassage an der Detektorelektrode in vorbestimmter Weise eingestellt.

Erfindungsgemäß erfolgt die Partikelfokussierung mit mindestens zwei Fokussierelektroden, die an einer Wand, z. B. dem Boden des Kompartiments angeordnet sind. Mit zwei Elektroden können die Partikel hin zur gegenüberliegenden Wand des Kompartiments in Detektornähe verschoben werden. Dies kann vorteilhaft sein, wenn z. B. zur Impedanzspektroskopie eine vergrößerte Messzeit (oder: verringerte Strömungsgeschwindigkeit) gewünscht ist, wie es am Rand der Strömung gegeben ist.

Alternativ können drei Fokussierelektroden verwendet werden, von denen zwei auf einer Wand des Kompartiments konvergierend, z. B. zur Bildung einer trichterförmigen Feldbarriere angeordnet sind. Die dritte Elektrode ist als Gegenelektrode auf der gegenüberliegenden Wand des Kompartiments angeordnet. Diese Ausführungsform kann von Vorteil sein, da eine 3-dimensionale Fokussierung im Kompartiment mit einer relativ geringen Elektrodenzahl erzielt wird.

Besonders bevorzugt wird die Erfindung jedoch mit zwei Fokussierelektrodenpaaren umgesetzt, die an gegenüberliegenden Seiten des Kompartiments (z. B. Boden, Deckel) angeordnet sind.

Jedes Fokussierelektrodenpaar besteht aus zwei Fokussierelektroden, z. B. in Form von konvergierenden Elektrodenstreifen. Die Verwendung von zwei Fokussierelektrodenpaaren kann zur Einstellung vorbestimmter Trajektorien durch eine trichterförmige Feldbarriere von Vorteil sein.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird der mindestens eine gemessene Impedanzwert nicht nur in Bezug auf das Vorhandensein eines Partikels, sondern auch in Bezug auf die dielektrischen Eigenschaften des jeweils erfassten Partikels ausgewertet. Vorteilhafterweise können damit zusätzliche Informationen über die strömenden Partikel erhalten werden, wie z. B. Informationen über den Vitalitätszustand einer Zelle oder dgl..

Gemäß einer weiteren, vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung werden mit mindestens einem Impedanzdetektor eine Vielzahl von Impedanzwerten erfasst und deren Zeitverlauf in Bezug auf den Zeitpunkt, die Richtung und/oder die Geschwindigkeit des Vorbeitritts mindestens eines Partikels am Impedanzdetektor ausgewertet. Damit wird vorteilhafterweise der Anwendungsbereich der herkömmlichen Impedanz-Partikelzählung auf die Erfassung weiterer Merkmale der Partikel oder des Mikrosystems erweitert. Hierzu wird vorzugsweise eine asymmetrische Elektrodenform realisiert, die sich allgemein dadurch auszeichnet, dass die Elektrodenform in einer Richtung parallel zur Durchtritts- oder Strömungsrichtung nicht spiegelsymmetrisch in Bezug auf Achsen senkrecht zur Durchtritts- oder Strömungsrichtung ist.

Wenn ein Impedanzdetektor mit einem einzelnen Detektorelektrodenpaar verwendet wird, das sich jeweils durch eine in Bezug auf die Strömungsrichtung asymmetrische Elektrodenform aus-

zeichnet, so ergibt sich bei einem vereinfachten Aufbau die Möglichkeit, aus dem Zeitverlauf von Impedanzwerten die genannten Messgrößen abzuleiten. Wenn mehrere, voneinander beabstandet angeordnete Impedanzdetektoren verwendet werden, sind asymmetrische Elektrodenformen nicht erforderlich.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die Impedanzwerte mit einem Impedanzdetektor mit Detektorelektroden erfasst werden, wobei sich die Form mindestens einer der Detektorelektroden in einer Richtung parallel zur Strömungsrichtung der Flüssigkeit ändert und/oder die Detektorelektroden auf einander gegenüberliegenden Seiten des Kompartiments angeordnet sind und verschiedene Formen besitzen. Damit kann mit nur einem Impedanzdetektor eine Zeitabhängigkeit der Impedanzänderung im Verlauf des Partikelvorbeitritts aufgenommen und ausgewertet werden.

Ein Gegenstand der Erfindung ist auch eine Messeinrichtung zur Impedanzmessung in einem fluidischen Mikrosystem mit mindestens einem Impedanzdetektor, der in einem von einer Flüssigkeitsströmung durchsetzten Kompartiment des Mikrosystems angeordnet ist, und mindestens einer Fokussiereinrichtung, die mindestens mit zwei Fokussierelektroden zur Ausübung dielektrophoretischer Kräfte auf suspendierte Partikel ausgestattet ist, die durch das Kompartiment strömen. Die Bereitstellung der mindestens zwei Fokussierelektroden ermöglicht die Formung einer trichterförmigen Feldbarriere zur Partikelfokussierung und besitzt den Vorteil einer optimalen Integrationsfähigkeit der erfindungsgemäßen Messeinrichtung in an sich bekannte fluidische Mikrosysteme auf der Basis von Fluidikchips.

Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform der Messeinrichtung umfasst die Fokussiereinrichtung mindestens zwei Paare von Fokussierelektroden, die im Kompartiment die trichterförmige Feldbarriere bilden. Eine Feldbarriere wird durch eine Verteilung hochfrequenter Felder, die von den Fokussierelektroden ausgehen und dielektrophoretische Abstoßungskräfte auf die Partikel ausüben, gebildet. Eine trichterförmige Feldbarriere zeichnet sich durch eine Feldverteilung aus, die abgesehen von einem Feldminimum (z. B. in der Mitte des Kompartiments) Rückhaltekräfte bildet, so dass Partikel mit der Flüssigkeitsströmung nicht vorbeistreichen können und durch das Feldminimum gezwungen werden. Mit der trichterförmigen Feldbarriere können die Partikel vorteilhafterweise an einer vorbestimmten Position den Impedanzdetektor passieren.

Der Impedanzdetektor umfasst jeweils mindestens zwei Detektorelektroden, die vorzugsweise mit einer planaren Form an einer Wand oder verschiedenen, z. B. gegenüberliegenden Wänden des Kompartiments angebracht sind. Wenn eine der planaren Detektorelektroden eine relativ zur Strömungsrichtung ungleichförmige Gestalt besitzt, liefert der Impedanzdetektor bei Aufnahme einer Zeitreihe von Impedanzwerten zusätzliche Informationen über die detektierten Partikel oder das Mikrosystem. Die Gestalt der Detektorelektroden wird durch deren äußere Form oder durch Strukturierungen festgelegt. Die äußere Form umfasst bspw. Dreieck-, Oval-, Rechteck- oder Kreisformen oder aus diesen zusammengesetzte Formen. Als Strukturierung ist bspw. ein Elektrodendurchbruch oder eine Passivierungsschicht auf der Elektrode vorgesehen. Alternativ kann der Impedanzdetektor an sich eine zur Strömungsrichtung ungleichförmige oder asymmetrische Gestalt besitzen, in dem die Detektorelektroden verschieden geformt oder relativ zueinander versetzt angeordnet sind. Auch bei dieser Gestaltung besitzt die Änderung der

Kapazität zwischen den Detektorelektroden bei Vorbeitritt eines Partikels eine charakteristische Zeitabhängigkeit, die im Impedanzmesswert die zusätzlichen Informationen, z. B. über die Strömungsrichtung, liefert.

Wenn die mindestens eine Elektrodenstrukturierung durch mindestens eine Detektorelektrode gebildet wird, in deren Fläche eine Teilelektrode integriert ist, kann vorteilhafterweise mit einer besonders hohen Empfindlichkeit gemessen werden. Dabei besitzt die Teilelektrode vorzugsweise eine charakteristische Größe, die gleich oder kleiner als die Größe der senkrechten Projektion des vorbeitretenden Partikels auf die Detektorelektrode mit der Teilelektrode ist.

Wenn der Impedanzdetektor mindestens zwei Detektorelektroden umfasst, die an mindestens einer Wand des Kompartiments angeordnet sind und sich über die Breite des Kompartiments quer zur Strömungsrichtung erstrecken, ergibt sich ein besonders einfacher Aufbau des Impedanzdetektors. Dabei werden die Detektorelektroden vorzugsweise durch gerade Elektrodenstreifen gebildet, die parallel zur Strömungsrichtung an den Wänden des Kompartiments übereinander angeordnet sind und Elektrodenstreifen mit verschiedenen Breiten und/oder strukturierten Rändern aufweisen, wobei die strukturierten Ränder quer zur Strömungsrichtung versetzt angeordnet sind.

Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Die dielektrophoretische Fokussierung ist bei Anwendung zur Detektion von Zellen besonders schonend. Die Fokussierung kann bei Wechsel der Teilchenart oder der Betriebsbedingungen leicht geändert werden. Die Messeinrichtung lässt sich mit an sich bekannten Prozessierungstechniken als Teil bekannter Fluidikchips herstellen.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung der beigefügten Zeichnungen ersichtlich. Es zeigen:

Figuren 1 bis 4: verschiedene Ausführungsformen erfindungsgemäßer Messeinrichtungen,

Fig. 5: verschiedene Ausführungsformen erfindungsgemäß verwendeter Fokussierelektroden,

Fig. 6: verschiedene Ausführungsformen erfindungsgemäß verwendeter Detektorelektroden,

Fig. 7: eine Kurvendarstellung eines experimentell ermittelten Impedanzverlaufs, und

Fig. 8: weitere Ausführungsformen erfindungsgemäß verwendeter Detektorelektroden.

Die Figuren 1 bis 4 illustrieren verschiedene Ausführungsformen erfindungsgemäßer Kombinationen aus Fokussiereinrichtungen und Impedanzdetektoren, die jeweils in einem Kanal eines fluidischen Mikrosystems angeordnet sind. Fluidische Mikrosysteme, insbesondere zur Manipulierung biologischer Zellen, sind an sich bekannt und werden daher mit weiteren Einzelheiten hier nicht beschrieben.

Figur 1 zeigt einen Kanal 10 des Mikrosystems in schematischer Draufsicht (a) und Seitenansicht (b). Der Kanal 10 wird durch die Seitenwände 11, 12, einen Boden 13 und eine Deckfläche 14 begrenzt. Der Abstand zwischen den Seitenflächen 11, 12 liegt vorzugsweise im Bereich von 100 µm bis 1 mm, bspw. im Bereich

von 200 bis 800 μm (Breite des Kanals), während der Abstand zwischen dem Boden 13 und der Deckfläche 14 vorzugsweise rund 5 μm bis 200 μm , z. B. 20 bis 100 μm beträgt (Höhe des Kanals). Der Kanal 10 wird von einer Flüssigkeitsströmung in Pfeilrichtung durchströmt. Die Flüssigkeitsströmung ist typischerweise eine laminare Strömung mit dem illustrierten Geschwindigkeitsprofil 15 und mit einer Strömungsgeschwindigkeit im Bereich von z. B. 20 $\mu\text{m/s}$ bis 20 mm/s. In der Flüssigkeitsströmung sind Partikel 16 suspendiert, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren detektiert werden sollen. Die Partikel 16 bewegen sich in Strömungsrichtung mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Flüssigkeit. Vor der erfindungsgemäßen Fokussierung ruhen die Partikel relativ zur Flüssigkeit.

Die Partikel 16 umfassen bspw. synthetische Partikel (z. B. Kunststoffbeads) oder biologische Zellen oder Zellbestandteile oder biologisch relevante organische Makromoleküle.

Im Kanal (oder Kompartiment) 10 ist eine erfindungsgemäße Messeinrichtung 20 vorgesehen, die eine dielektrophoretische Fokussiereinrichtung 30 und einen Impedanzdetektor 40 umfasst. Die Fokussiereinrichtung 30 ist stromaufwärts relativ zum Impedanzdetektor 40 angeordnet. Die Seitenwände des Kanals sind zwischen der Fokussiereinrichtung 30 und dem Impedanzdetektor 40 durchgehend ohne seitliche Öffnungen.

Die Fokussiereinrichtung 30 umfasst mindestens zwei Fokussierelektroden 31, 32. Beim dargestellten Beispiel sind zwei Paare von Fokussierelektroden 31-34 vorgesehen, von denen das erste Paar 31, 32 bspw. an der Deckfläche 14 und das zweite Paar 33, 34 auf dem Boden 13 angeordnet sind. Jede Fokussierelektrode umfasst einen geraden Elektrodenstreifen, der jeweils an der Deckfläche 14 oder am Boden 13 vom Kanalrand hin zur Kanalmit-

te gerichtet ist. Die Enden 35 der Fokussierelektroden sind voneinander beabstandet. Die Fokussierelektroden sind jeweils über eine Anschlussleitung (nicht dargestellt) mit einer Steuereinrichtung (mit Hochfrequenzspannungsquelle) verbunden.

Der Impedanzdetektor 40 ist in Strömungsrichtung vorzugsweise mit einem Abstand im Bereich von 10 μm bis 2 mm von der Fokussiereinrichtung 30 angeordnet. Der Impedanzdetektor umfasst mindestens zwei Detektorelektroden 41, 42, die am Boden 13 und an der Deckfläche 14 des Kanals 10 angeordnet sind. Jede Detektorelektrode 41, 42 kann an sich aufgebaut sein, wie es von herkömmlichen Impedanzmessungen in Elektrolyten bekannt ist. Vorzugsweise besitzen sie jeweils eine planare Elektrodenfläche mit einer asymmetrischen oder ungleichförmigen Gestalt (s. unten).

Die Partikel 16 strömen mit der Flüssigkeit allgemein ungeordnet durch den Kanal 10, bis sie an die Fokussiereinrichtung 30 gelangen. An dieser wird mit den Fokussierelektroden 31-34 bei gleichförmiger Spannungsbeaufschlagung eine trichterförmige Feldbarriere gebildet, die sich in Strömungsrichtung verengt. Die Enden 35 der Fokussierelektroden 31-34 spannen ein Viereck auf, in dem sich ein Feldminimum befindet, durch das die Partikel 16 hindurchtreten können. Anschließend sind die Partikel 16 in einem Teilbereich der Strömung entsprechend der Lage des Feldminimums, z. B. in der Mitte des Kanals, aufgereiht. In dieser Aufreihung passieren die Partikel die Detektorelektroden 41, 42. An diesen erfolgt die Impedanzmessung nach an sich bekannten Prinzipien.

Beim Aufbau gemäß Fig. 1 erfolgt mit symmetrischen Fokussierelektroden 31-34 eine Fokussierung in der Kanalmitte sowohl in horizontaler Richtung, d. h. in der Mitte zwischen den Seiten-

flächen 11, 12, als auch in vertikaler Richtung, d. h. in der Mitte zwischen dem Boden 13 und der Deckfläche 14. Es ist nicht unbedingt notwendig, jeweils immer in vertikaler und horizontaler Richtung zu fokussieren. Es ist nicht zwingend erforderlich, dass die Partikel 16 in der Kanalmitte fokussiert aufgereiht werden. Allgemein ist der Teilbereich der Strömung, in dem die Partikel 16 aufgereiht sind, bei senkrechter Projektion auf die Boden- und Deckflächen mit den Detektorelektroden 41, 42 ausgerichtet. In vertikaler Richtung ergibt sich die Fokussierung aus dem Gleichgewicht zwischen elektrischen Feldkräften und der Gewichtskraft. Bei gleich wirkenden elektrischen Feldkräften und Gewichtskräften werden die Partikel 16 in dem Gleichgewicht in der Mitte zwischen den Boden- und Deckflächen 13, 14 aufgereiht. Alternativ können andere Gleichgewichtspositionen insbesondere durch die Form und/oder Höhe der Feldbarriere eingestellt werden, die mit den Fokussierelektroden 31-34 gebildet wird (siehe auch Fig. 4).

Die Fokussierung und die Detektion erfolgen jeweils unter Verwendung von Hochfrequenzspannungen. Es gehört zu den wichtigen und unerwarteten Erkenntnissen der Erfinder, dass eine ggf. störende, gegenseitigen Beeinflussung von Fokussierung und Detektion vermieden werden kann. Hierzu erfolgen die Fokussierung des mindestens einen Partikels und die Messung des mindestens einen Impedanzwertes bei verschiedenen Frequenzen. Es werden beispielsweise verschiedene (getrennte) Frequenzbereiche verwendet. Zellschonendes Fokussieren kann durch Verwendung einer Fokussierfrequenz oberhalb einiger 100 kHz erzielt werden. Für die Impedanzmessung ist dieser Bereich auszuschließen. Vorzugsweise erfolgt die Impedanzmessung bei einer Frequenz unterhalb von z.B. 100 kHz. Die Impedanzmessung kann alternativ bei höheren Frequenzen erfolgen (z. B. 1 MHz), um Informationen über den Innenraum der Partikel, z. B. den

Elektrolytgehalt in Zellen zu erhalten. Entsprechend würden die Fokussierelektroden bei noch höheren oder ggf. bei niedrigeren Frequenzen betrieben werden. Alternativ oder für eine weitere Entkopplung zwischen Fokussierung und Detektion kann der Impedanzdetektor 40 mit einem Frequenzfilter, z. B. einem Tief- oder Bandpassfilter ausgestattet sein. Mit dem Frequenzfilter werden die Frequenzen von der Detektion ausgenommen, bei denen die Fokussierelektroden betrieben werden.

Die Wechselwirkung zwischen Fokussiereinrichtung 30 und Impedanzdetektor 40 kann auch durch Erhöhung des gegenseitigen Abstandes in Strömungsrichtung vermindert werden. Vorzugsweise beträgt der Abstand rd. 10 μm bis 2 mm. Dies ist vorteilhafterweise durch die Laminarität der Strömung im Kanal 10 möglich. Der Abstand kann bspw. auch auf bis zu 3 mm erhöht werden.

Der Impedanzdetektor 40 kann gemäß der Draufsicht in Fig. 2 aus mehreren verschiedenen Detektorelektroden 41, 42 und 43 aufgebaut sein. Auf den Boden- und Deckflächen 13, 14 ist ein Detektorelektrodenpaar aus zwei relativ großflächigen Detektorelektroden 41, 42 vorgesehen. Beide Detektorelektroden 41, 42 besitzen die gleiche Außenform. In der schematischen Draufsicht ist lediglich die obere Elektrode 42 vollständig dargestellt. Im unteren Teil von Fig. 2 ist zu Illustrationszwecken die untere Elektrode 41 gezeigt. Die obere Detektorelektrode 42 enthält eine Elektrodenstrukturierung, indem in die obere Detektorelektrode eine dritte Detektorelektrode 43 (Teilelektrode 43) integriert ist. Sie ist in einer Ausnehmung der Elektrodenfläche der oberen Elektrode 42 mit Abstand von dieser angeordnet. Durch den Abstand ist teilweise die untere Elektrode 41 erkennbar. Beispielsweise besitzen die größeren Detektorelektroden 41, 42 Dimensionen von rd. 120 \cdot 150 μm ,

während die einzelne, kleinere Teilelektrode 43 eine Größe entsprechend typischen Zellgrößen in der Biologie von z. B. 2 bis 20 μm besitzt.

Die drei Detektorelektroden 41-43 gemäß Fig. 2 sind vorzugsweise nach dem in Fig. 3 illustrierten Prinzip geschaltet. Die untere Detektorelektrode 41 wird mit einer Treiberspannung mit einer vorbestimmten Messfrequenz beaufschlagt (z. B. $U < 1\text{ V}$, $f = 50\text{ kHz}$). Die obere Detektorelektrode 42 liegt auf Massepotential. Zwischen der oberen Detektorelektrode 42 und der dritten Detektorelektrode (Teilelektrode) 43 ist ein elektrischer Widerstand R angeordnet, der entsprechend dem Widerstand der im Kompartiment strömenden Flüssigkeit dimensioniert ist. Die Messspannung U wird an der dritten Teilelektrode 43 gegenüber Massepotential abgenommen. Die erfindungsgemäße Impedanzmessung erfolgt derart, dass laufend die Spannung U erfasst und die Impedanz ermittelt wird. Sobald sich ein Partikel über der dritten Teilelektrode 43 befindet, wird diese abgeschirmt, so dass die Spannung U steigt.

Wenn der zu messende Partikel über die kleine Teilelektrode 43 geführt wird, ergibt sich somit eine Spannungsdifferenz zwischen den Elektroden 42 und 43. Diese Messung ist vorteilhafterweise besonders empfindlich, da mit der Teilelektrode 43 wie mit einer virtuellen Öffnung ein Messbereich hoher örtlicher Auflösung und Empfindlichkeit geschaffen wird. Die Teilelektrode 43 sollte daher vorzugsweise nicht wesentlich größer als die Projektion des Partikels auf die Elektrodenebene sein. Des weiteren ist eine genaue Fokussierung mit den Fokussierelektroden von Vorteil. In Kombination mit den trichterförmigen Fokussierelektroden kann so die Impedanz und Durchgangsrichtung des Partikels mit erhöhter Genauigkeit und Reproduzierbarkeit gemessen werden (siehe auch Fig. 7).

Ein Vorteil der in den Fign. 2 und 3 illustrierten Ausführungsform der Erfindung besteht in der Möglichkeit, die Partikel mit einer hohen Genauigkeit über die kleine, dritte Elektrode 43 zu führen. Durch die dielektrophoretische Fokussierung wird anstelle der herkömmlichen Coulter-Düse ein "virtuelles" Fenster erzeugt, das präzise in Bezug auf die dritte Elektrode 43 ausgerichtet ist. Dadurch kann ein besonders hohes Signal-Rausch-Verhältnis erzielt werden.

In den Figuren 4a (Draufsicht) und 4b (Seitenansicht) ist schematisch die Fokussierung in vertikaler Richtung illustriert. Bei dieser Ausführungsform umfasst der Impedanzdetektor 40 ein Detektorelektrodenpaar 44, das nur auf der Deckfläche 14 angeordnet ist. Als Fokussiereinrichtung 30 werden zwei Paare von Fokussierelektroden 31, 32 und 33, 34 verwendet, von denen die unteren Fokussierelektroden 33, 34 in Strömungsrichtung um eine Strecke dx länger ausgebildet sind, als die oberen Fokussierelektroden 31, 32. Dadurch wird die Feldbarriere verzerrt, das Feldminimum wird von der Kanalmitte hin zur Deckfläche 14 verschoben, so dass die Partikel 16 in einen Teilbereich der Strömung fokussiert werden, der nahe dem Detektorelektrodenpaar 44 ist. Der geringste Abstand der Partikel 16 vom Detektorelektrodenpaar 44 beträgt bspw. $1\text{ }\mu\text{m}$.

Die Ausführungsform gemäß Figur 4 mit den in Strömungsrichtung versetzt angeordneten oder mit verschiedenen Längen ausgebildeten Elektroden kann den Vorteil haben, dass die Partikel bei ungeänderter (horizontaler) Fokussierung zwischen den Seitenflächen in vertikaler Richtung näher an die Elektrode 44 oder gemäß Figur 2 an die Teilelektrode 43 geführt werden, wo sie erstens langsamer laufen und zweitens ein erhöhtes Impedanz-

signal zeigen. Dieser Prozess kann über eine Rückkopplung selbstkalibrierend ausgeführt werden, so dass das Impedanzsignal sich vorteilhafterweise bei Partikeldurchtritt durch Veränderung der Amplitude einer der Elektroden-Ebenen in Abhängigkeit von der Strömungsgeschwindigkeit und/oder den Partikeleigenschaften optimieren und maximieren lässt.

Alternativ oder zusätzlich zu der versetzten Anordnung der Elektroden kann zur Einstellung des senkrechten Abstandes der Partikel von den Elektroden des Impedanzdetektors vorgesehen sein, dass die Fokussierelektroden mit einer unterschiedlich starken Ansteuerung (Amplitude, Frequenz) der beiden Elektrodenebenen betrieben und/oder die Fokussierelektroden mit verschiedenen Winkeln relativ zur Strömungsrichtung ausgebildet sind.

Erfindungsgemäß kann die Messeinrichtung zusätzlich mit einer Defokussiereinrichtung 50 ausgestattet sein, die im rechten Teil der Figuren 4a und 4b schematisch illustriert ist. Die Defokussiereinrichtung 50 besitzt die Aufgabe, die Partikel nach der Messung wieder im gesamten Strömungsprofil zu verteilen, oder im Bereich der größten Strömungsgeschwindigkeit anzureichern. Damit kann vorteilhafterweise die Adhäsionswahrscheinlichkeit der Partikel untereinander (insbesondere von biologischen Zellen) verringert und der Durchsatz erhöht werden. Die Defokussiereinrichtung 50 umfasst Defokussierelektroden 51 bis 54, die analog zu den oben genannten Prinzipien eine Verschiebung der Partikel in der Flüssigkeit durch negative Dielektrophorese bewirken.

Die Fokussier- oder Defokussierelektroden einer erfindungsgemäßen Messeinrichtung sind vorzugsweise als Elektrodenstreifen mit einer Anordnung entsprechend der gewünschten Feldbarriere

gebildet. Abweichend von den oben beschriebenen Ausführungsformen können die Elektrodenstreifen in der jeweiligen Wandebene (z. B. in der Bodenfläche) gekrümmt sein, wie dies im Teilbild a der Fig. 5 illustriert ist. An die konvergierenden Elektrodenabschnitte 35, 36 schließen sich 2 gerade, parallele Elektrodenabschnitte 37, 38 an. Die Ausbildung gerader, paralleler Elektrodenabschnitte an den in Strömungsrichtung gelegenen Enden der Fokussierelektroden kann in Bezug auf die Wirksamkeit der Feldbarriere vorteilhaft sein.

In den Teilbildern b und c sind Ausführungsformen von Fokussierelektroden gezeigt, die aus drei Teilelektroden bestehen. Gemäß Fig. 5b bspw. sind die Fokussierelektroden 31, 32 an der Deckfläche eines Kompartiments angeordnet, während die fokussierende Gegenelektrode 39 auf der Bodenfläche angeordnet ist. Vorteilhafterweise kann mit dieser Anordnung eine dreidimensionale Fokussierung im Kompartiment mit nur drei Elektroden erzielt werden. Die Feldbarriere wird bspw. durch Anlegen hochfrequenter Wechselspannungen mit einer jeweils versetzten Phasenlage erzeugt. Die Phasenlage beträgt bspw.: 31: 0° , 32: 120° , 39: 240° oder: 31: 0° , 32: 180° , 39: Massepotential. Die Anordnung gemäß Fig. 5b ist mit den Fokussierelektrodenformen gemäß Fig. 5a modifizierbar (siehe Fig. 5c).

Gemäß einer alternativen Ausführungsform der Erfindung kann die Anordnung von Fokussierelektroden gleichzeitig als Detektoreinrichtung verwendet werden. Hierzu werden die Elektrodenstreifen zur Erzeugung einer trichterförmigen Feldbarriere konvergierend so zusammengeführt, dass die Elektroden spitzen in Strömungsrichtung einen geringen Abstand besitzen, der etwa der Kanalhöhe entspricht. Die Fokussierelektroden (z. B. gemäß Fig. 1) werden mit Hochfrequenzspannungen zur Fokussierung beaufschlagt. Die Impedanz wird diagonal, also bspw. zwischen

den Elektroden 31 und 34 oder 32 und 33 gemessen. Bei einer Gestaltung gemäß den Fign. 5b oder 5c kann die Impedanzmessung zwischen einer der Elektroden 31, 32 und der Gegenelektrode 39 erfolgen.

Bei der Passage eines Partikels an einem Impedanzdetektor hängt das gemessene Impedanzsignal neben den dielektrischen Eigenschaften (insbesondere Dielektrizitätskonstante, Leitfähigkeit) des Partikels und der Suspensionslösung auch vom Volumenanteil des Partikels zwischen den Messelektroden ab. Wenn die Messelektroden relativ zur Strömungsrichtung ungleichförmig oder asymmetrisch aufgebaut sind, wie dies beispielhaft in Fig. 6 illustriert ist, wird bei der Partikelpassage mit einer konstanten Strömungsgeschwindigkeit ein im Zeitverlauf ungleichförmiges Impedanzsignal gemessen. Das Impedanzsignal ist im Bezug auf das Maximum asymmetrisch. Aus dem Kurvenverlauf kann neben der Strömungsgeschwindigkeit auch die Strömungsrichtung bestimmt werden (s. Fig. 7). Zur Bereitstellung ungleichförmiger oder asymmetrischer Messelektroden erhalten diese eine bestimmte Elektrodenform und/oder eine Elektrodenstrukturierung. Die Elektrodenstrukturierung umfasst bspw. Durchbrüche oder Löcher in der Elektrodenfläche. Alternativ können auch Passivierungen durch Passivierungsschichten auf der Elektrodenfläche vorgesehen sein. Die Figuren 6a und 6b zeigen beispielhaft Elektrodenflächen 44 mit kreisförmigen Durchbrüchen 45 (oder Passivierungsschichten). Eine asymmetrische Elektrodenfläche eines erfindungsgemäßen Impedanzdetektors ist gegeben, wenn die wirksame Elektrodenfläche sich in Strömungsrichtung verändert. Dies ist hier bspw. durch die Aneinanderreihung der Durchbrüche 45 gegeben. Alternativ kann die Variation der Elektrodenfläche gemäß den Figuren 6c bis 6f auch durch Veränderungen der äußeren Gestalt bereitgestellt werden. Die Umrandung der Elektrodenfläche zeichnet sich durch

mindestens eine Dreieck-, Rechteck-, Oval- oder Kreisstruktur aus.

Die Messelektroden bestehen aus einem inerten, leitfähigen Material, insbesondere Metall, wie z. B. Platin oder Gold. Die Passivierungsschichten bestehen aus einem isolierenden Material, z. B. Siliziumoxid.

Figur 7 zeigt beispielhaft den Zeitverlauf eines Impedanzsignals, das mit einem asymmetrischen Impedanzdetektor gemäß Fig. 2 aufgenommen wurde. Der Kurvenverlauf zeigt das Impedanzsignal (willkürliche Einheiten) in Abhängigkeit von der Zeit. Die oben eingezeichneten Kreise markieren Partikeldurchgänge, die durch eine Videokontrolle ermittelt wurden. Bei jedem Partikeldurchgang zeigt die Impedanzkurve eine charakteristische Asymmetrie relativ zum jeweiligen Maximum. Auf beiden Seiten eines Maximums sind zwei Nebenmaxima (Schultern) messbar, von denen die im Zeitverlauf zweite Schulter eine geringere Amplitude besitzt als die erste Schulter. Daraus lässt sich die Strömungsrichtung ableiten. Aus dem Abstand dt zwischen den Minima jeweils zwischen einer Schulter und dem Maximum kann des Weiteren die Strömungsgeschwindigkeit abgeleitet werden, da dt der Durchgangszeit der Partikel entspricht und die Größe der Messelektrode bekannt ist.

Alternativ zu der asymmetrischen Elektrodenform gemäß Fig. 2 oder Fig. 6 lassen sich die in Fig. 7 gezeigten Merkmale auch durch Kombinationen mehrerer, in Strömungsrichtung voneinander beabstandeter Messmethoden erfassen.

Die Fig. 8a und b zeigen Ausführungsformen von zwei Impedanzsensoren, die sich quer zur Strömungsrichtung (siehe Pfeil) über die Breite des gesamten Kanals erstrecken. Beispielsweise

sind die gestrichelte Elektrode 42 oben und die durchgezogene Elektrode 41 unten an den Deck- und Bodenflächen (siehe oben) oder umgekehrt angeordnet (schematisch und vergrößert gezeigt). Beim Durchgang von Partikeln und insbesondere biologischen Zellen wird mit diesen Detektoren ein asymmetrisches Impedanz-Signal erzeugt, mit dem sich die Partikel zählen lassen oder das die Bestimmung der Richtung des Durchganges ermöglicht.

Beim Aufbau gemäß Figur 8 kann das Signal/Rauschverhältnis ungünstiger als bei den oben beschriebenen Einzelsensoren sein, was sich aber vorteilhafterweise durch die Verwendung einer geeigneten Brückenmessung kompensieren lässt.

Die erfindungsgemäße Impedanzmessung kann wie folgt modifiziert werden. Die Fokussierelektroden können strukturiert werden, wie dies aus der Mikrosystemtechnik zur Bereitstellung vorbestimmter Felddbarrierenverläufe an sich bekannt ist. Die fokussierenden Felddbarrieren können auch durch Steuerung der Spannung und/oder Phase der hochfrequenten elektrischen Felder in der Fokussiereinrichtung modifiziert werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Impedanzmessung in einem fluidischen Mikrosystem mit einem Kompartiment, das von einer Strömung einer Flüssigkeit mit mindestens einem suspendierten Partikel durchsetzt wird und in dem mindestens ein Impedanzdetektor angeordnet ist, mit dem zur Detektion des mindestens einen Partikels mindestens ein Impedanzwert erfasst wird, der für die Impedanz des Kompartiments charakteristisch ist und der sich bei Anwesenheit des mindestens einen Partikels in vorbestimmter Weise ändert, wobei eine Fokussierung des mindestens einen Partikels in einen vorbestimmten Abstand relativ zum Impedanzdetektor erfolgt,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Fokussierung eine Bewegung des mindestens einen Partikels relativ zur im Kompartiment strömenden Flüssigkeit durch dielektrophoretische Kräfte umfasst, die mit mindestens zwei Fokussierelektroden ausgeübt werden.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Fokussierung stromaufwärts relativ zum Impedanzdetektor erfolgt.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Fokussierung unmittelbar am Impedanzdetektor erfolgt.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem die Fokussierung eine Bewegung des mindestens einen Partikels in einen Teilbereich der strömenden Flüssigkeit umfasst, in dessen senkrechter Projektion auf eine Wand des Kompartiments der Impedanzdetektor angeordnet ist.

5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Fokussierung eine Bewegung des mindestens einen Partikels derart umfasst, dass sich der senkrechte Abstand des Partikels vom Impedanzdetektor verringert.

6. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem synthetische oder biologische Partikel an dem Impedanzdetektor vorbeitreten.

7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der mindestens eine Impedanzwert in Bezug auf dielektrische Eigenschaften des jeweils vorbeitretenden Partikels ausgewertet wird.

8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem eine Vielzahl von Impedanzwerten erfasst wird, deren Zeitverlauf in Bezug auf den Zeitpunkt, die Richtung und/oder die Geschwindigkeit des Vorbeitritts des Partikels ausgewertet werden.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, bei dem aus dem Zeitverlauf der Impedanzwerte eine Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit erfasst wird.

10. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, bei dem die Impedanzwerte mit dem Impedanzdetektor erfasst werden, wobei der jeweils detektierte Partikel an Detektorelektroden des Impedanzdetektor vorbeitritt, wobei sich die Form mindestens einer der Detektorelektroden in einer Richtung parallel zur Strömungsrichtung der Flüssigkeit ändert.

11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10, bei dem die Impedanzwerte mit dem Impedanzdetektor erfasst werden, wobei

der jeweils detektierte Partikel an Detektorelektroden des Impedanzdetektor vorbeitrifft, die auf einander gegenüberliegenden Seiten des Kompartiments angeordnet sind und verschiedene Formen besitzen.

12. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 8 bis 11, bei dem die Impedanzwerte mit dem Impedanzdetektor und mindestens einem weiteren, in Strömungsrichtung beabstandet angeordneten Impedanzdetektor erfasst werden.

13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Fokussierung des mindestens einen Partikels und die Messung des mindestens einen Impedanzwertes bei verschiedenen Frequenzen erfolgen.

14. Messeinrichtung zur Impedanzmessung in einem fluidischen Mikrosystem, mit:

- einem Impedanzdetektor, der in einem von einer strömenden Flüssigkeit durchsetzten Kompartiment des Mikrosystems angeordnet ist, und
- einer Fokussiereinrichtung, mit der der mindestens eine Partikel in die Nähe des Impedanzdetektors verschiebbar ist,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Fokussiereinrichtung mindestens zwei Fokussierelektroden zur Ausübung dielektrophoretischer Kräfte auf das mindestens eine Partikel umfasst, wobei die Fokussiereinrichtung eine trichterförmige Feldbarriere im Kompartiment bildet.

15. Messeinrichtung gemäß Anspruch 14, bei der die Fokussiereinrichtung stromaufwärts relativ zum Impedanzdetektor angeordnet ist.

16. Messeinrichtung gemäß Anspruch 14, bei der der Impedanzdetektor Teil der Fokussiereinrichtung ist.

17. Messeinrichtung gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16, bei der mindestens zwei Paare von Fokussierelektroden auf gegenüberliegenden Wänden des Kompartiments vorgesehen sind, die die trichterförmige Feldbarriere bilden.

18. Messeinrichtung gemäß einem der Ansprüche 14 oder 17, bei der die Fokussierelektroden in Strömungsrichtung verschiedene Längen besitzen.

19. Messeinrichtung gemäß einem der Ansprüche 14 bis 18, bei der der Impedanzdetektor mindestens zwei Detektorelektroden umfasst, die an einer Wand oder verschiedenen Wänden des Kompartiments angeordnet sind.

20. Messeinrichtung gemäß Anspruch 19, bei der mindestens eine der Detektorelektroden in einer Bezugsrichtung parallel zur Strömungsrichtung eine ungleichförmige Gestaltung besitzt oder beide Detektorelektroden in einer Bezugsrichtung parallel zur Strömungsrichtung verschiedene Formen aufweisen.

21. Messeinrichtung gemäß Anspruch 20, bei der die mindestens eine Detektorelektrode eine Gestaltung besitzt, die

- mindestens ein Dreieck,
- mindestens eine Streifen-Fläche-Kombination, und/oder
- mindestens eine Elektrodenstrukturierung umfasst.

22. Messeinrichtung gemäß Anspruch 21, bei der die mindestens eine Elektrodenstrukturierung einen Elektrodendurchbruch oder eine Elektrodenpassivierungsschicht umfasst.

23. Messeinrichtung gemäß Anspruch 21, bei der die mindestens eine Elektrodenstrukturierung durch mindestens eine Detektorelektrode gebildet wird, in deren Fläche eine Teilelektrode integriert ist.

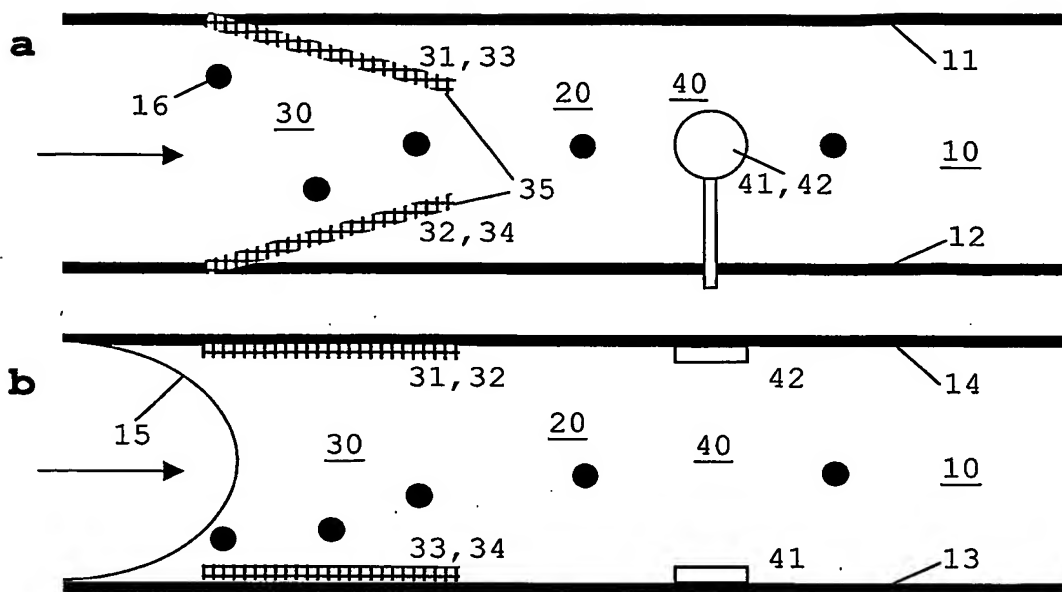
24. Messeinrichtung gemäß einem der Ansprüche 21 bis 23, bei der die Teilelektrode eine charakteristische Größe aufweist, die im Wesentlichen gleich der Größe oder kleiner als die Größe der senkrechten Projektion des Partikels auf die Ebene der Detektorelektrode mit der Teilelektrode ist.

25. Messeinrichtung gemäß einem der Ansprüche 19 bis 24, bei der der Impedanzdetektor mindestens zwei Detektorelektroden umfasst, die an mindestens einer Wand des Kompartiments angeordnet sind und sich über die Breite des Kompartiments quer zur Strömungsrichtung erstrecken.

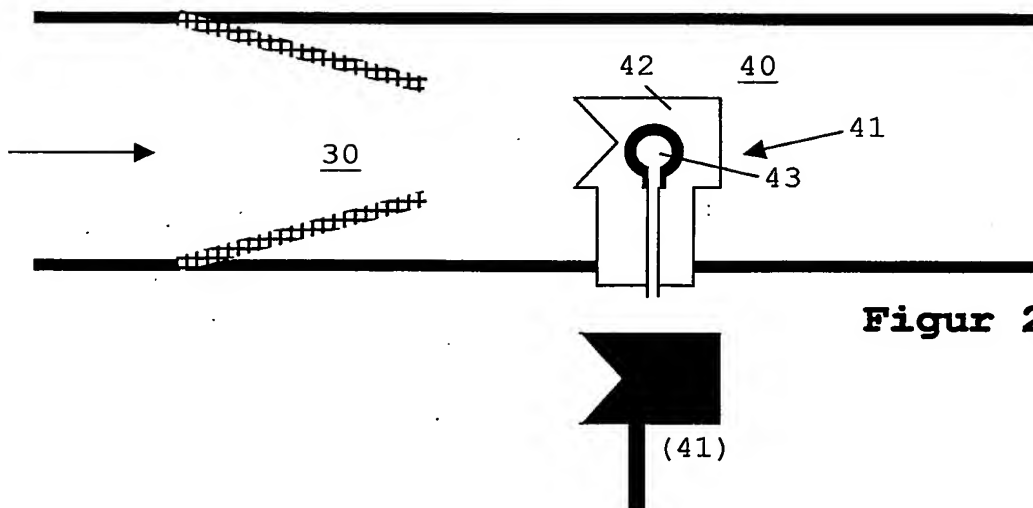
26. Messeinrichtung gemäß Anspruch 25, bei der die Detektorelektroden gerade Elektrodenstreifen umfassen, die parallel zur Strömungsrichtung an den Wänden des Kompartiments übereinander angeordnet sind, wobei die Elektrodenstreifen verschiedene Breiten und/oder strukturierte Ränder aufweisen, die quer zur Strömungsrichtung versetzt angeordnet sind.

27. Messeinrichtung gemäß einem der Ansprüche 14 bis 26, bei der mindestens ein weiterer, in Strömungsrichtung beabstandet angeordneter Impedanzdetektor vorgesehen ist.

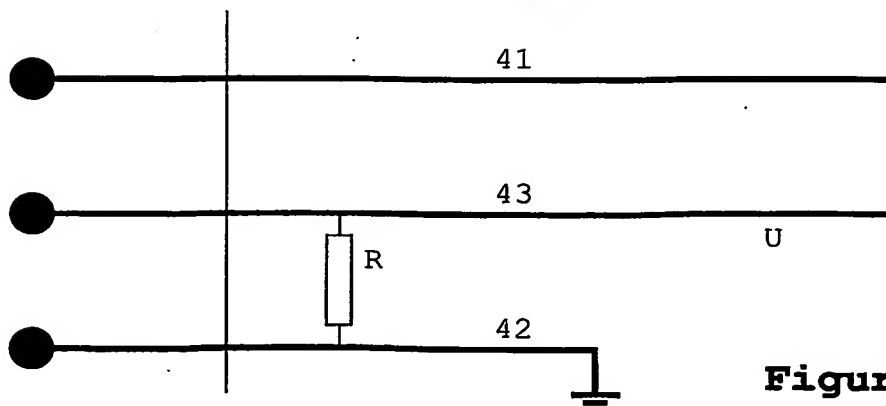
28. Messeinrichtung gemäß einem der Ansprüche 14 bis 27, bei der der mindestens eine Impedanzdetektor mit einem Frequenzfilter ausgestattet ist, mit dem Frequenzen, bei denen die Fokussiereinrichtung betrieben wird, filterbar sind.



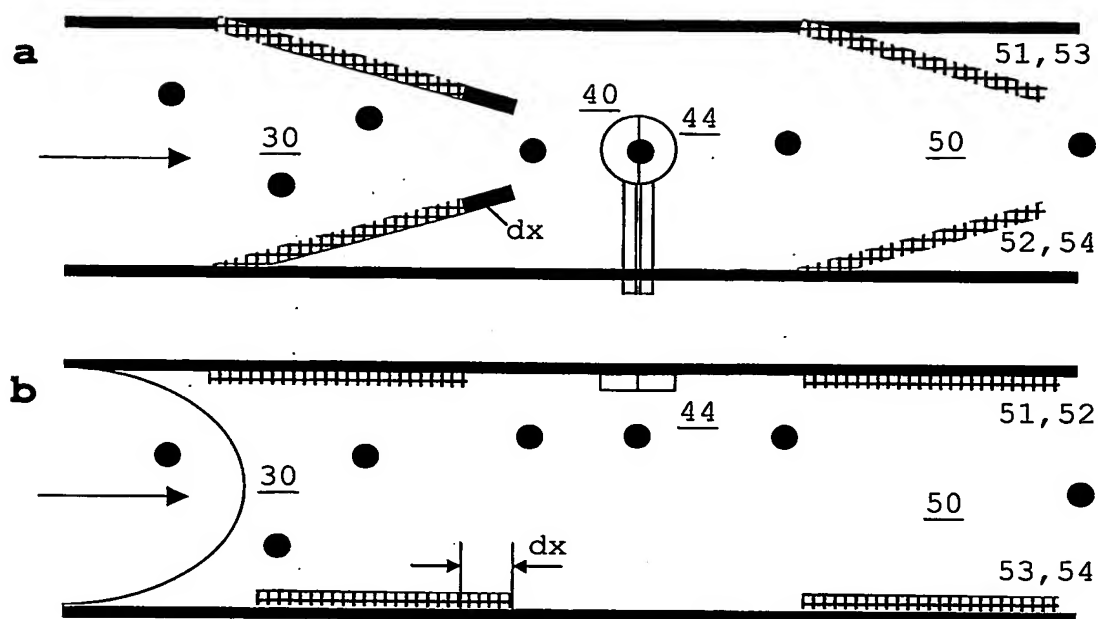
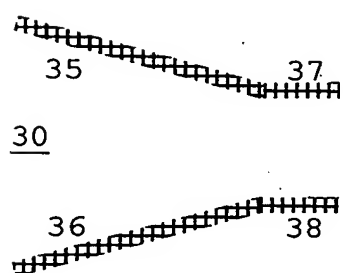
Figur 1



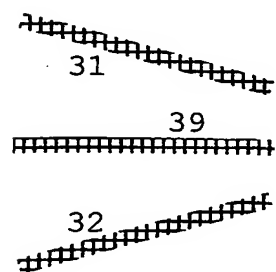
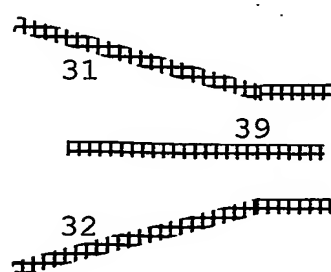
Figur 2



Figur 3

**Figur 4**

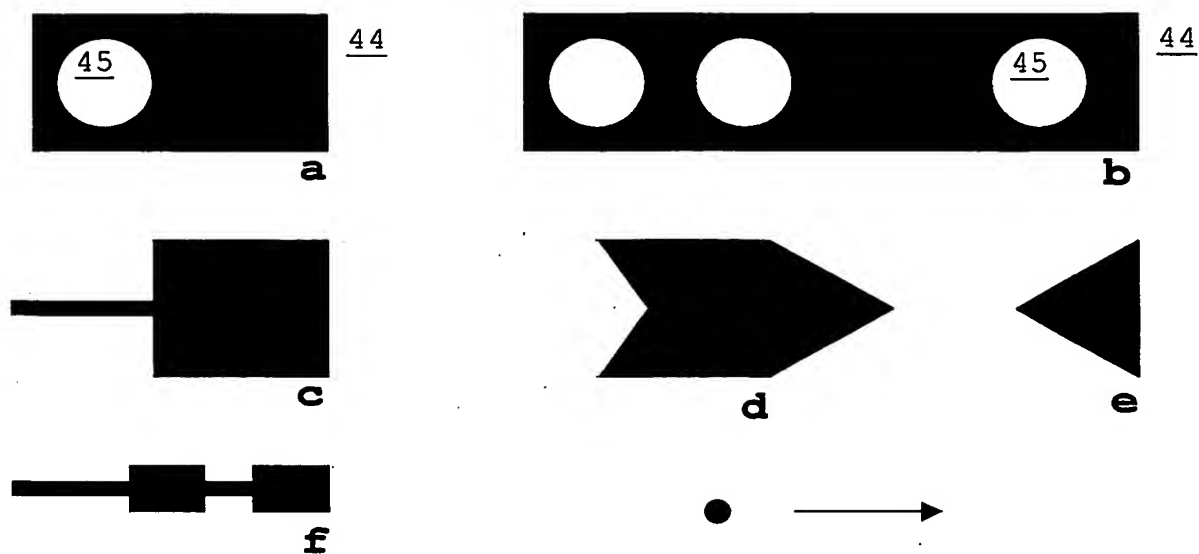
a

**b**

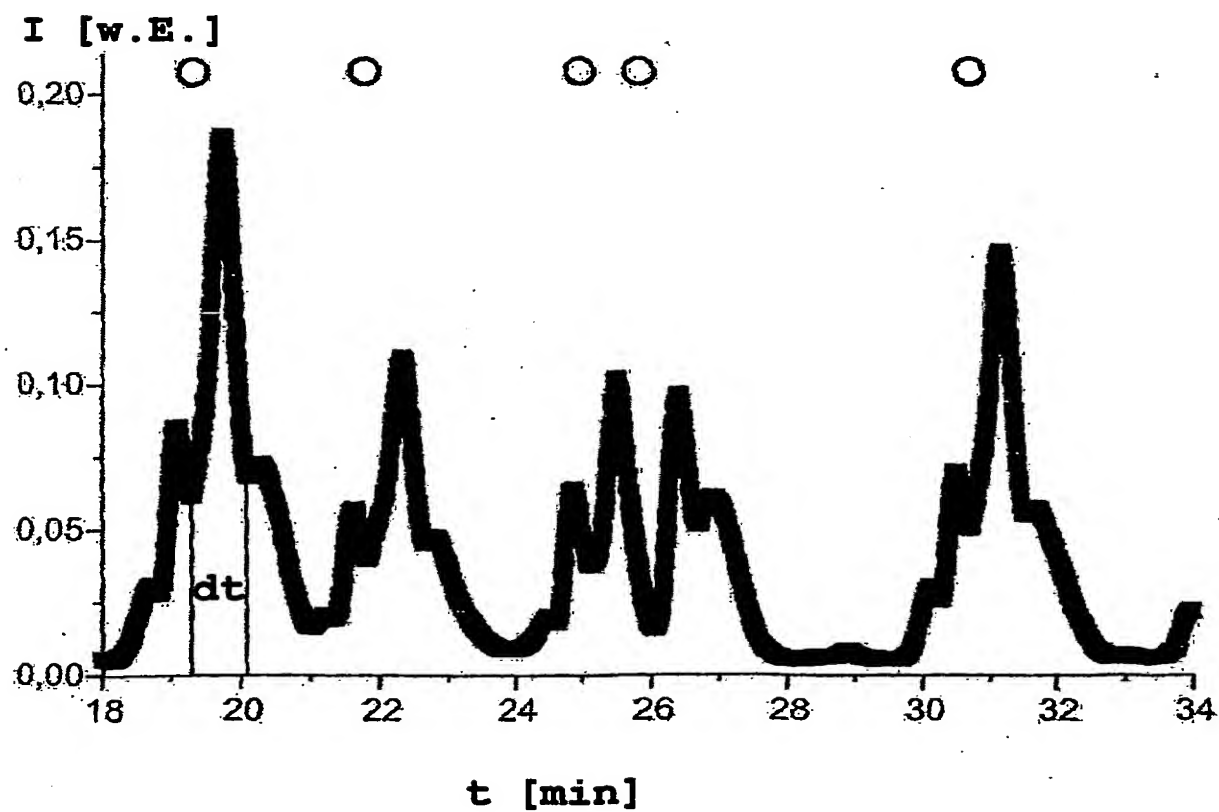
c

Figur 5

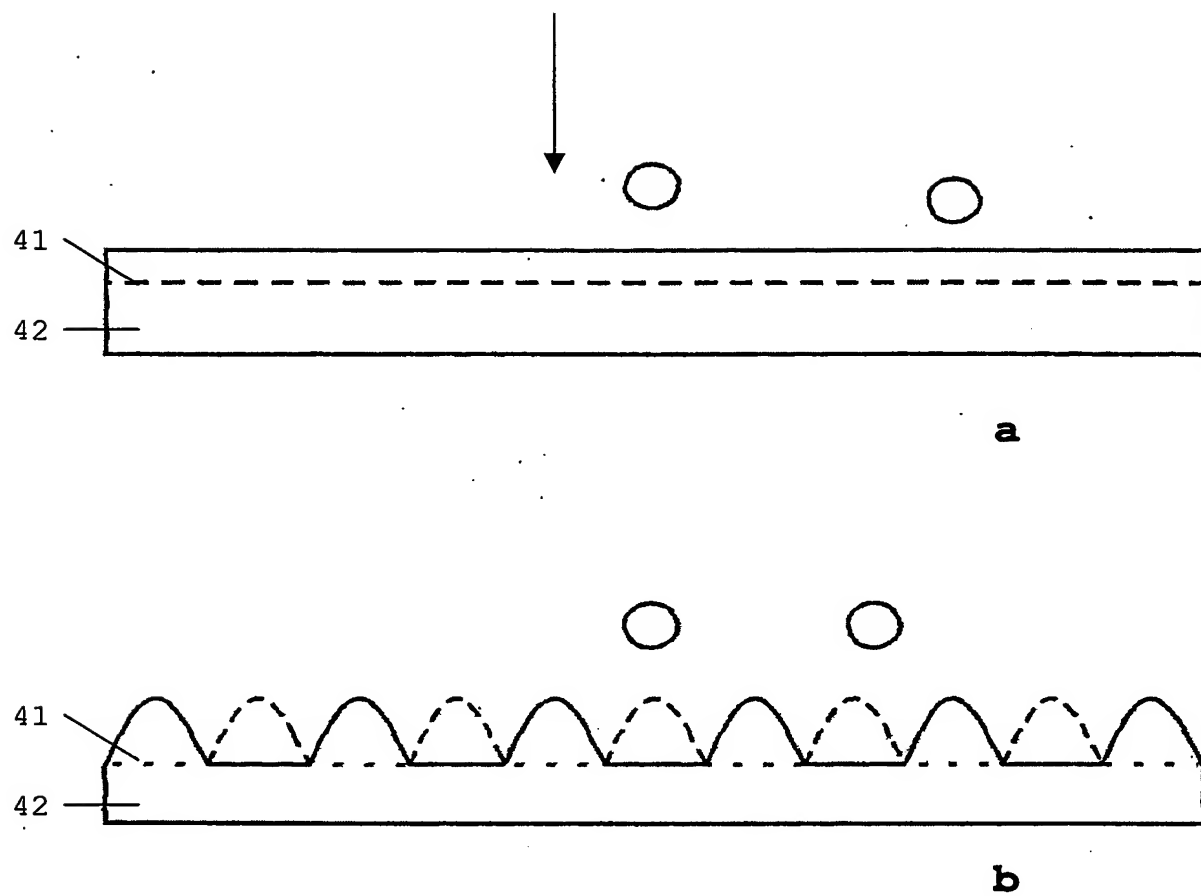
3/4



Figur 6



Figur 7

**Figur 8**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 03/08312

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N15/12 //G01N27/02,C12M1/42,B03C5/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12M B03C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 4 420 720 A (NEWTON WILLIAM A ET AL) 13 December 1983 (1983-12-13) the whole document ---	1-20,27, 28 21,22
X	DE 22 01 894 A (LICENTIA GMBH) 19 July 1973 (1973-07-19) the whole document ---	1-10,12, 14-17, 19,20,27
P,X	US 2002/150886 A1 (MILES ROBIN R ET AL) 17 October 2002 (2002-10-17) the whole document	1
X	-& US 2002/076690 A1 (MILES ROBIN R ET AL) 20 June 2002 (2002-06-20) the whole document --- -/--	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 December 2003

Date of mailing of the international search report

29/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Koch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/08312

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00 37628 A (FUHR GUENTER ;GRADL GABRIELE (DE); MUELLER TORSTEN (DE); SCHNELLE) 29 June 2000 (2000-06-29) cited in the application page 2, paragraph 2 page 5, paragraph 2 page 9, line 9 -page 10, line 24 page 12, paragraph 3 -page 19, paragraph 2 page 13, line 1 -page 13, line 4 page 14, paragraph 2 figures 1-11	1-28
Y		21
Y		22
A	DE 100 59 152 A (EVOTEC OAI AG) 20 June 2002 (2002-06-20) the whole document	17,18, 21-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/08312

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4420720	A	13-12-1983	NONE	
DE 2201894	A	19-07-1973	DE 2201894 A1	19-07-1973
			AU 455258 B2	21-11-1974
			AU 3959972 A	06-09-1973
			BE 780440 A1	03-07-1972
			CA 953786 A1	27-08-1974
			CH 558529 A	31-01-1975
			ES 400399 A1	01-01-1975
			FR 2132004 A5	17-11-1972
			GB 1322686 A	11-07-1973
			JP 54035115 B	31-10-1979
			NL 7202865 A	12-09-1972
			SE 375614 B	21-04-1975
US 2002150886	A1	17-10-2002	US 2002076690 A1	20-06-2002
WO 0037628	A	29-06-2000	DE 19859459 A1	29-06-2000
			WO 0037628 A1	29-06-2000
			EP 1141264 A1	10-10-2001
			JP 2002533081 T	08-10-2002
			US 6492175 B1	10-12-2002
DE 10059152	A	20-06-2002	DE 10059152 A1	20-06-2002
			WO 0243870 A1	06-06-2002
			EP 1337342 A1	27-08-2003

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N15/12 //G01N27/02, C12M1/42, B03C5/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N C12M B03C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 420 720 A (NEWTON WILLIAM A ET AL) 13. Dezember 1983 (1983-12-13)	1-20, 27, 28
Y	das ganze Dokument	21, 22
X	DE 22 01 894 A (LICENTIA GMBH) 19. Juli 1973 (1973-07-19)	1-10, 12, 14-17, 19, 20, 27
	das ganze Dokument	
P, X	US 2002/150886 A1 (MILES ROBIN R ET AL) 17. Oktober 2002 (2002-10-17)	1
X	das ganze Dokument -& US 2002/076690 A1 (MILES ROBIN R ET AL) 20. Juni 2002 (2002-06-20)	1
	das ganze Dokument	
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 - *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
 - *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Dezember 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/12/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Koch, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 00 37628 A (FUHR GUENTER ;GRADL GABRIELE (DE); MUELLER TORSTEN (DE); SCHNELLE) 29. Juni 2000 (2000-06-29) in der Anmeldung erwähnt Seite 2, Absatz 2 Seite 5, Absatz 2 Seite 9, Zeile 9 -Seite 10, Zeile 24 Seite 12, Absatz 3 -Seite 19, Absatz 2 Seite 13, Zeile 1 -Seite 13, Zeile 4 Seite 14, Absatz 2 Abbildungen 1-11 -----	1-28
Y		21
Y		22
A	DE 100 59 152 A (EVOTEC OAI AG) 20. Juni 2002 (2002-06-20) das ganze Dokument -----	17,18, 21-23

INTERNATIONALER RECHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Zeichen

PCT/EP 03/08312

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4420720	A	13-12-1983	KEINE	
DE 2201894	A	19-07-1973	DE 2201894 A1	19-07-1973
			AU 455258 B2	21-11-1974
			AU 3959972 A	06-09-1973
			BE 780440 A1	03-07-1972
			CA 953786 A1	27-08-1974
			CH 558529 A	31-01-1975
			ES 400399 A1	01-01-1975
			FR 2132004 A5	17-11-1972
			GB 1322686 A	11-07-1973
			JP 54035115 B	31-10-1979
			NL 7202865 A	12-09-1972
			SE 375614 B	21-04-1975
US 2002150886	A1	17-10-2002	US 2002076690 A1	20-06-2002
WO 0037628	A	29-06-2000	DE 19859459 A1	29-06-2000
			WO 0037628 A1	29-06-2000
			EP 1141264 A1	10-10-2001
			JP 2002533081 T	08-10-2002
			US 6492175 B1	10-12-2002
DE 10059152	A	20-06-2002	DE 10059152 A1	20-06-2002
			WO 0243870 A1	06-06-2002
			EP 1337342 A1	27-08-2003

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.